SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN VON INFLUENZA A 2/HONGKONG-INFEKTIONEN BEI SCHWEINEN IN BAYERN

von

Siegfried Moser

1972

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten
der Tiere der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. A. Mayr

SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN VON INFLUENZA A2/HONGKONG-INFEKTIONEN BEI SCHWEINEN IN BAYERN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Von
Siegfried M o s e r
aus
Passau im Bayrischen Wald

München 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. Boessneck

Referent: Prof. Dr. A.Mayr

Korreferent: Prof. Dr. J.Kalich

Tag der Promotion: 11.Februar 1972

TOP SERVICE GMBH, 8 München 22, Steinsdorfstr. 18

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	E I N L E I T U N G	1
2.	S C H R I F T T U M	3
2.1.	Vorkommen von Influenza A2/Hong Kong-Infektionen beim Tier	3
2.1.1.	Virusisolierungen	3
2.1.2.	Serologische Untersuchungen	4
2.1.3.	Experimentelle Untersuchungen	7
2.2.	Vorkommen von Influenza A2/Hongkong-Kong-Infektionen beim Schwein	12
2.2.1.	Allgemein	12
2.2.2.	Influenza A/swine/Taiwan/70	13
2.2.3.	Serologische Untersuchungen	15
2.2.4.	Experimentelle Untersuchungen	18
3.	E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N	19
3.1.	Material und Methoden	19
3.1.1.	Virus	19
3.1.2.	Seren	20
3.1.2.1.	Herkunft der Seren	20
3.1.2.2.	Behandlung der Seren	21
3.1.3.	Hämagglutinationshemmungstest	23
3.1.4.	Neutralisationstest	24

Seite

3.2. Ergebnisse 25

3.2.1. Untersuchung von unbehandelten Seren bezüglich Vorkommen von hämagglutinationshemmenden Antikörpern gegen Influenza A2/Hongkong/1/68 (EIR) 25

3.2.2. Untersuchungen von Kaolin-vorbehandelten Seren auf das Vorkommen hämagglutinationshemmender Antikörper gegen Influenza A2/Hongkong/1/68 (EIR) 26

3.2.3. Vergleich der HAH-Titer von unbehandelten und Kaolin-vorbehandelten Seren 27

3.2.4. Ergebnisse vergleichender Neutralisationsteste 29

3.3. Diskussion 30

4. Z U S A M M E N F A S S U N G 35

5. T A B E L L E N

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 37

7. L E B E N S L A U F

1. EINLEITUNG

Seit den Arbeiten von Shope (39), Francis (16), Andrewes (1) und Smith (49) über die antigenen Beziehungen der Influenzaviren des Menschen zu dem Virus der Schweineinfluenza ist die Diskussion um das Schwein als mögliches Virusreservoir für die in regelmäßigen Intervallen auftretenden Influenzaepidemien nie ganz verstummt.

In der Zwischenzeit wurde sehr viel auf diesem Gebiet gearbeitet, doch die Fragen und Probleme sind nicht geringer geworden. So konnte z.B. durch die Testung von Seren älterer Menschen nachgewiesen werden, daß die die letzten großen Grippewellen auslösenden Stämme, A2/Japan -1957 und A2/Hongkong-1968, bereits um die Jahrhundertwende (1889/90 - A2/Japan, 1900-Hongkong) Pandemien verursacht haben. Im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen mußte nun auch das Pferd als mögliches Reservoir in Betracht gezogen werden, da festgestellt wurde, daß nicht nur der 1968 isolierte A2/Hongkong-Stamm, sondern auch der von 1900 eine enge antigene Verwandtschaft zu dem Influenza A-equi2-Virus besitzt (31, 12, 29, 56, 23, 30, 55, 13, 17).

Aber auch Vögel und eine Reihe anderer wildlebender Tiere muß inzwischen aufgrund epidemiologischer Untersuchungen als verdächtige Überträger oder Zwischenwirte Beachtung geschenkt werden (11, 47, 23).

Die Rolle des Schweines in diesem komplizierten Geschehen gewann erneutes Interesse, als Kundin (27) während der letzten großen Influenzawelle 1968 aus Schweinen ein Virus isolierte, das antigen mit dem Influenza A2/Hongkong-Virus identisch ist. Der Stamm A/swine/Taiwan/69 unterscheidet sich nur durch eine geringere Morbidität für den Menschen.

Um die Bedeutung dieser Befunde zu klären, regte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Kontrolle der Schweinebestände in den verschiedensten Ländern bezüglich Vorkommen von Influenza A2/Hongkong-Infektionen an.
Aufgabe vorliegender Arbeit ist es, mit Hilfe serologischer Methoden das Vorkommen und die Verbreitung von Infektionen mit dem Influenzavirus A2/Hongkong bei Schweinen in Bayern zu untersuchen.

2. S C H R I F T T U M

2.1. Vorkommen von Influenza A2/Hongkong-Infektionen beim Tier

2.1.1. Virusisolierungen

Obwohl seit langem bekannt ist, daß humane Influenzaviren die verschiedensten Haus- und Wildtiere zu infizieren vermögen (23,47,30,46), liegen kaum Berichte über die Isolierung von Influenza A2/Hongkong-Virus aus Tieren vor (27). Diese Tatsache hat verschiedene Gründe. Die Erfahrungen der letzten Pandemien sowie serologische Untersuchungen haben gelehrt, daß natürlich vorkommende Infektionen durch humane Influenzastämme beim Tier in der Regel klinisch inapparent verlaufen. Isolierungen werden aber hauptsächlich bei klinisch erkrankten oder zumindest verdächtigen Individuen versucht. Systematische Anzüchtungsversuche aus gesunden Tieren verschiedener Populationen erfordern einen enormen Aufwand an Zeit und Material. So beschränken sich die zur Zeit bekannten Isolierungen auf einen Zufallsbefund (UdSSR) und auf das Ergebnis einer großangelegten Untersuchung von Schlachtschweinen in Taiwan (27).

Nach einem Bericht der WHO gelang russischen Forschern in Ostsibirien die Isolierung von Influenza A2/Hongkong aus einem Hund, der mit respiratorischen Symptomen erkrankt war.

Über die Ergebnisse der Isolierungsversuche aus Schweinen soll weiter unten ausführlich die Rede sein (Siehe Kapitel 2.2.2).

2.1.2. Serologische Untersuchungen

Über das Vorkommen spezifischer Antikörper gegen das Influenza A2/Hongkong-Virus bei Haus- und Wildtieren ist in den vergangenen 3 Jahren viel gearbeitet worden. Diese Untersuchungen, die vor allem mit dem Hämagglutinationshemmungstest (HAH-Test) und dem Neutralisationstest und z.T. mit dem Neuraminidasehemmungstest durchgeführt werden, sind dadurch belastet, daß ein Großteil der tierischen Seren Inhibitoren gegen die Influenzaviren, insbesondere gegen Influenza A2/Hongkong/68, besitzen (18). Korrekte serologische Testergebnisse sind deshalb nur zu erwarten, wenn die Seren mit einer wirksamen Methode vorbehandelt wurden oder wenn ein inhibitor-resistenter Virusstamm verwendet wurde. Da noch manche Unklarheit besteht, welche Inhibitorbehandlung in bezug auf Art des Serums und des betreffenden Stammes die optimale ist, ist es oft schwierig, die Resultate verschiedener Arbeitsgruppen miteinander zu vergleichen (3).

Trotz dieser Unsicherheiten kann aber heute schon gesagt werden, daß spezifische Antikörper gegen die Hongkong-Variante auch beim Tier vorkommen. Auffällig ist dabei, daß das Auftreten von Serumtitern gegen diesen Stamm in den Tierbeständen in der Regel der Erkrankungswelle beim Menschen zeitlich parallel lief oder nur geringgradig gegenüber dieser verzögert war.

Nur einmal sind bis jetzt im Zusammenhang mit dem Auftreten von Hongkong-Infektionen beim Tier klinische Erkrankungen gemeldet worden (32).

Diese Beobachtung läßt den Schluß zu, daß unter natürlichen Bedingungen Infektionen mit dem Influenzavirus A2/Hongkong beim Tier klinisch inapparent verlaufen.

Im Herbst 1969 erkrankten in Bulgarien sehr viele Pferde an einer fieberhaften Affektion des Respirationstraktes (32). Durch HAH-Teste konnte nachgewiesen werden, daß von 17 untersuchten Serumpaaren 10 einen Titeranstieg gegen das Influenza A2/Hongkong-Virus (UdSSR) zeigten. Gleichzeitig konnten Mitreaktionen gegen Influenza A-equi2/Miami und bei 5 Seren gegen Influenza A-equi1/Prag registriert werden. Die Untersuchungsergebnisse sprachen jedoch deutlich für eine Infektion durch den humanen Influenzastamm. Die beobachteten heterologen Titer wurden auf die enge antigene Verwandtschaft zwischen A2/Hongkong und A-equi2 bzw. auf eine früher stattgefundene Infektion durch die beiden equinen Stämme zurückgeführt.

Blaskovic et al. (6,7) untersuchten 825 Pferde verschiedener Altersgruppen aus slowakischen Gestüten. Die Serumproben waren 1967 gesammelt worden. In HAH-Testen reagierten 99,9 % gegen einen inhibitor-empfindlichen und 2,3 % gegen einen inhibitor-resistenten Hongkong-Stamm positiv. Wurden die Seren mit Perjodat vorbehandelt, konnten gegen den resistenten Stamm keine Antikörper mehr nachgewiesen werden. 6,4 % der Seren behielten auch nach Perjodat-Behandlung ihren Titer gegen den inhibitor-empfindlichen Stamm. Obwohl keine Serumtiter gegen Influenza A-equi2 und nur zu einem geringen Prozentsatz gegen A-equi1 (5,5 %) in diesen Pferdeseren gefunden wurden, stellen die Autoren die Spezifität dieser Befunde in Frage.

Aus Berichten der WHO geht hervor, daß Antikörper gegen die Hongkong-Variante der humanen Influenzaviren auch in anderen Tierarten gefunden werden können.

Bei Hunden ist der Prozentsatz positiv reagierender Tiere allerdings auch relativ niedrig. Er liegt nach Untersuchungen aus den USA zwischen 4,2 % und 6,7 %, wobei eine geringgradige Zunahme von Hunden mit Serumtitern parallel zu den Erkrankungen beim Menschen, zwischen April 1969 (71 untersuchte Seren) und März 1970 (164 untersuchte Seren) stattfand.

Ungefähr die gleiche prozentuale Verteilung von Hunden mit spezifischen Antikörpern erbrachte die Testung von Seren im März 1970 in Großbritannien (36 untersuchte Seren, 5,5 % positiv).

Dagegen reagierten von 200 Hundeseren in der Tschechoslowakei nur 2 mit Influenza A2/Hongkong. Die Seren waren während einer mit respiratorischen Symptomen einhergehenden Epizootie der Hunde gesammelt worden. Die Ätiologie dieser Epizootie war unbekannt.

HAH-Teste mit Katzenseren sind von Paniker und Nair (34) durchgeführt worden. Sie prüften 28 Seren von Hauskatzen verschiedener Altersgruppen. Nach Vorbehandlung mit Perjodat bzw. Perjodat und Trypsin konnten in sechs der Seren hohe HAH-Titer ($\geq$ 1:80) festgestellt werden.

Erhebungen in der UdSSR zeigten, daß auch Hühner Antikörper gegen das Hongkong-Virus bilden können. Von einer zufälligen Auswahl von 171 Hühnerseren reagierten 32 positiv.

Über das Vorkommen von Influenza A2-Infektionen bei Schafstelzen (mutton bird, shearwaters, Puffinus chlororhynchus) der nordaustralischen Inselwelt berichteten Dasen et al. (11). Die Ergebnisse aus Neuraminidase-Testen mit 320 Seren ließen erkennen, daß nicht nur Infektionen mit Geflügelstämmen sondern auch mit dem humanen Influenzavirus A2/Asian/57 stattgefunden haben müssen. Zu einem geringeren Prozentsatz wurden auch Reaktionen mit Influenza A2/Hongkong beobachtet. Die Autoren wiesen deshalb auf die Möglichkeit hin, daß auch wildlebende Vögel als Virusreservoir für humane Influenzastämme dienen können.

2.1.3. Experimentelle Untersuchungen

Experimentell läßt sich das Influenzavirus A2/Hongkong auf sehr unterschiedliche Tierarten übertragen. Klinische Erkrankungen werden dabei allerdings nur in Ausnahmefällen beobachtet. Die Tiere beantworten die experimentelle Infektion in der Regel nur mit der Bildung spezifischer Antikörper und gegebenenfalls mit der Ausscheidung von infektiösem Virus, d.h. sie setzen sich klinisch inapparent mit dem Virus auseinander.

Kalter et al. (20) infizierten 29 Paviane mit dem Hongkong-Stamm. Neben Serumneutralisationstitern (bis 1:128) bei 15 Tieren und der Ausscheidung von infektiösen Virus bis zum 7. Tag p.inf. konnten sie die Übertragung der Infektion auf Kontakttiere beobachten. Die per Kontakt infizierten Paviane entwickelten ebenfalls Antikörper und schieden Virus aus.

Johnsen et al. (19), die ein ähnliches Experiment mit Gibbons (Hylobates lar lar) durchführten, machten in einem ersten Versuch die gleichen Beobachtungen. Bei allen Tieren verlief die Infektion klinisch inapparent und führte nur zur Bildung von Antikörpern und zur Ausscheidung von Virus. Als sie aus technischen Gründen in einem weiteren Infektionsversuch ohne Isolierungsmaßnahmen arbeiteten, erkrankten innerhalb von 2-3 Wochen von den 100 Gibbons der Kolonie 36. Die klinischen Symptome bestanden in einer eitrigen Rhinitis, Husten, vermindertem Allgemeinzustand, Gewichtsverlust, gastrointestinalen Störungen, die von Obstipationen bis zu Durchfällen reichten, und Fieber. Die akute Phase der Erkrankung klang in 3-6 Tagen ohne Behandlung ab. Bei einigen Tieren war die Rekonvaleszenz verzögert, sie dauerte bis zu 30 Tagen. 4 der erkrankten Tiere starben, 2 waren künstlich infiziert worden, die anderen 2 Gibbons waren Kontakttiere. Während diese zwei Kontakttiere mit den typischen Symptomen einer schweren Influenzainfektion erkrankten, war der Verlauf der Erkrankung bei den zwei experimentell infizierten Tieren perakut. Im übrigen traten Erkrankungen nur bei den Kontakttieren auf. Die Reisolierung von Virus wurde aus Trachealtupfern erkrankter Tiere versucht. Aus 12 Proben konnte 5mal Virus angezüchtet werden.
Die Autoren testeten 15 Serumpaare, alle zeigten einen signifikanten Titeranstieg. Von den übrigen Tieren wurden nur einfache Serumproben untersucht. Nur 14 Tiere besaßen keine spezifischen Antikörper gegen Influenza A2/Hongkong (Serumausgangsverdünnung im HAH-Test 1:40). Die Höhe der Serumtiter lag zwischen 1:20 und 1:640 im HAH-Test.

Aufgrund der während dieser versehentlich ausgelösten Influenzaepidemie in einer Gibbonkolonie gemachten Beobachtungen wird angenommen, daß das Virus durch schnelle Wirtspassagen an Virulenz für den Gibbon gewonnen hatte. Es vermochte dadurch nach einer verzögerten Inkubationszeit von 2-3 Wochen Tiere, die bis dahin noch kein Virus aufgenommen hatten, krank zu machen. Diese Hypothese erklärt zugleich, warum künstlich infizierte Tiere nicht erkrankten. Bei den zwei perakut verstorbenen Gibbons aus der Versuchsgruppe scheint es sich um Tiere mit einem Defekt ihrer immunologischen Abwehrmechanismen zu handeln. Die Zweitinfektion mit dem virulenteren Virus führte deshalb zu einer Kumulierung und damit zum perakuten Verlauf und Tod.

Blaskovic et al. (6,7)gelang die experimentelle Infektion von 6 Pferden mit Influenza A2/Hongkong. Sie beobachteten bei allen Tieren eine leichte, atypisch verlaufende Erkrankung des Respirationstraktes, die durch Inappetenz, verminderten Allgemeinzustand und leichten Nasenfluß charakterisiert war. Die klinischen Symptome setzten am 2. bis 3. Tag p. inf. und verschwanden ohne Behandlung nach 2 Tagen. 5 Pferde waren kurz nach der intranasalen Infektion durch körperliche Anstrengung und niedrige Temperaturen bei hoher Luftfeuchtigkeit gestresst worden. Diese Tiere entwickelten kein Fieber, nur bei dem 6. Pferd, das nach der Infektion im Stall gelassen worden war, wurde ein leichter Temperaturanstieg am 2. und 3. Tag p. inf. beobachtet.

Virus konnte bis zum 5. Tag p. inf. aus Nasentupferproben, nicht aber aus Organen, isoliert werden.

3 von 4 getesteten Seren besaßen hämagglutinierende Antikörper gegen Influenza A2/Hongkong. Die Titer bewegten sich allerdings nur zwischen 1:16 und 1:32. Eine challenge-Infektion mit Influenza A-equi2/Miami ließ die Hongkong-Titer auf Werte zwischen 1:64 bis 1:256 ansteigen, während keine Reaktion auf das challenge-Virus festgestellt werden konnte.

In einem Übertragungsversuch mit 8 Ponies beobachteten Todd et al. (54) Virusausscheidung über das Nasensekret bis zum 7. Tag p. inf. sowie die Bildung neutralisierender und komplementbindender Antikörper gegen Influenza A2/Hongkong und A-equi2. Ein Pony reagierte auch mit A-equi1 positiv. Keines der infizierten Tiere erkrankte.

Ebenfalls mit Ponies arbeiteten Kasel und Couch (24) in vergleichenden Tierversuchen über die antigene Verwandtschaft der Hongkong-Variante und Influenza A-equi2. Die verwendeten Ponies (Chincoteague ponies) stammten von einer wildlebenden Herde. Sie besaßen vor Versuchsbeginn keine meßbaren neutralisierenden Antikörper gegen Influenza A2/Hongkong. 9 von 10 Tieren schieden infektiöses Virus bis zum 5. Tag p. inf. aus. 4 bildeten Antikörper (2 bis mehrfacher Titeranstieg). Bei 6 Tieren wurde eine kurze Fieberphase beobachtet, die ca. 30 Stunden nach der Infektion begann und 1 bis 3 Tage dauerte. 5 parallel mit einem humanen Influenzastamm (A2/Rockville/65), der keine antigene Beziehung zu A2/Hongkong besitzt, infizierte Ponies ließen keinerlei Reaktionen auf die Infektion erkennen.

Bei der challenge-Infektion mit Influenza A-equi2 wurde sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Hongkong-infizierten Versuchsgruppe Virusausscheidung und Antikörperbildung gegen beide Virusstämme beobachtet. 2 Hongkong-infizierte und 1 Kontrolltier zeigten eine kurzdauernde Fieberzacke. Das heißt, daß die Infektion der Tiere mit Influenza A2/Hongkong diesen keinen Schutz gegen eine nachfolgende A-equi2-Infektion verliehen hatte. Demgegenüber konnte von der gleichen Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, daß die künstliche Inokultion des Pferdestammes beim Menschen einen Immunschutz gegen beide Stämme hervorruft.

Die experimentelle Infektion von Hunden mit Influenza A2/Hongkong wurde nach Berichten der WHO in den USA versucht. Bis zu 5 Tage nach der intranasalen Verabreichung von infektiösem Eimaterial konnte Virus reisoliert werden. Ebenso konnte die Bildung spezifischer Antikörper beobachtet werden. Keines der 9 infizierten Tiere erkrankte. Die Infektion ließ sich auf Kontakttiere übertragen, allerdings nur, wenn diese kurz nach der Infektion (bis zu 24 Stunden) mit infizierten Tieren zusammengesperrt wurden. Wahrscheinlich erfolgte hierbei die Übertragung durch Virusreste im Fell und im Raum. Die Virusausscheidung über das Nasensekret scheint beim Hund für Kontaktinfektionen nicht auszureichen.

Auch Katzen können experimentell mit dem Influenza A2/Hongkong-Virus infiziert werden. Paniker und Nair (94) beobachteten Virusausscheidung über das Nasensekret und die Bildung hämagglutinationshemmender Antikörper bei intranasal infizierten Tieren sowie einer Katze, die mit einem erkrankten Menschen Kontakt hatte.

Auch bei diesen Versuchen lagen die Serumtiter nach der Erstinfektion relativ niedrig (maximal 1:80), um nach einer zweiten Infektion auf Werte zwischen 1:160 bis 1:1280 anzusteigen. Klinische Erkrankungen traten nicht auf. Die Autoren wiesen im Zusammenhang mit ihren Ergebnissen auf die mögliche Bedeutung der Hauskatzen als Virusträger hin.

Daß auch Kaltblüter für Influenza A2/Hongkong-Infektionen empfänglich sein können, bewiesen Sigel et al. (48). Sie inokulierten Delphinen das Virus intranasal. Die Tiere entwickelten hohe hämagglutinationshemmende und komplementbindende Antikörpertiter. Eine Erkrankung wurde aber auch bei den Delphinen nicht beobachtet.

Vorkommen von Influenza A2/Hongkong-Infektionen beim Schwein

Allgemein

Während der letzten großen Influenza-Pandemie von 1968 bis 1970, die durch den Stamm A2/Hongkong/68 ausgelöst wurde, gewann die Diskussion um das Schwein als mögliches Virusreservoir erneut an Aktualität. Der Grund hierfür war die ungefähr gleichzeitig mit einer Influenzawelle in der Bevölkerung Taiwans gelungene Isolierung eines Influenzavirus vom Schwein. Dieser neue Stamm A/swine/Taiwan/70 erwies sich als antigen identisch mit dem humanen Hongkong-Stamm.

Die Möglichkeit der Übertragung von Influenza-infektionen vom Schwein auf den Menschen und umgekehrt ist erstmals von Koen (26) erörtert worden. Durch serologische Untersuchungen konnte später festgestellt werden, daß die Pandemie von 1918 wirklich durch ein Schweineinfluenza-ähnliches Virus hervorgerufen worden war (2, 15).
Bis jetzt konnte aber noch kein derartiges Virus vom Menschen isoliert werden. Umgekehrt lag bis 1969 nur ein Bericht über die Anzüchtung klassischer humaner Influenzastämme aus dem Schwein vor (35). Ungeachtet dessen hatten bereits 1936 Shope und Francis (39, 15) experimentell beweisen können, daß Schweine für humane Influenzastämme empfänglich sind.

2.2.2. Influenza A/swine/Taiwan/70

Um weitere Anhaltspunkte über die Rolle des Schweines im Seuchengeschehen der Influenzainfektionen zu sammeln, untersuchte Kundin (27) ab Juni 1969 systematisch Nasentupfer und Serumproben von gesunden Schlachtschweinen aus verschiedenen Schlachthöfen von Taiwan. Fast gleichzeitig mit einer Erkrankungswelle in der Bevölkerung im Winter 1969/70 gelang ihm 13mal die Isolierung eines Influenzavirus. Dieser aus Schweinen isolierte Stamm - A/swine/Taiwan/70 - ließ sich aufgrund seiner antigenen Eigenschaften nicht von dem humanen Stamm A2/Hongkong/68 unterscheiden.

Mit einer kurzen zeitlichen Verschiebung zu der Isolierung von Virus stieg auch der Anteil der Tiere mit HAH-Titern gegen A/swine/Taiwan bzw. A2/Hongkong.

War in der Zeit von Juni bis November 1969 nur ein Serum von 591 untersuchten positiv, so reagierten im Dezember 1969 bereits 2 von 183 Schweinen. Den höchsten Prozentsatz positiver Seren konnte Kundin im Januar (48/276) und Februar (92/239) 1970 feststellen.

Schweine sind in diesem Zeitraum nicht an Influenza erkrankt. Alle Proben stammten zudem von klinisch gesunden, ca. 6 Monate alten Tieren.

Die experimentelle Übertragung von Influenza A/swine/Taiwan auf den Menschen zeigte (4), daß dieser Stamm eine geringere Pathogenität als das Hongkong-Virus für den Menschen besitzt. Außer einem leichten Schnupfen konnten keine klinischen Symptome beobachtet werden. Die Reaktion wurde als etwas intensiver als nach einer Schutzimpfung mit Lebendvaccine bezeichnet. 3 der 6 Versuchspersonen ließen einen signifikanten Antikörperanstieg gegen beide Stämme (A/swine/Taiwan und A2/Hongkong) im HAH- und Neuraminidasehemmungstest erkennen. Aus den Nasentupferproben von 3 Personen konnte Virus reisoliert werden.

2.2.3. Serologische Untersuchungen

Wie serologische Untersuchungen aus vielen Ländern verdeutlichen, scheinen, genau wie in Taiwan, parallel zu den beim Menschen aufgetretenen Epidemien auch in den Schweinebeständen der betroffenen Gebiete Influenza A2/Hongkong-Infektionen stattgefunden zu haben.

Von 200 im Jahre 1969 am Leipziger Schlachthof gesammelten Schweineseren reagierten 16 % im HAH-Test positiv. Serumtiter von 1:40 bis 1:320 besaßen 13 % aller Tiere. Die DDR erlebte den Höhepunkt der Hongkong-Grippeepidemie Anfang 1969 (36).

541 Schweine verschiedenen Alters und Geschlechts aus 21 Beständen der südwestlichen Slowakei wurden von Styk et al. (53) auf das Vorkommen hämagglutinationshemmender Antikörper getestet. Sie verwendeten einen inhibitorresistenten und einen inhibitorempfindlichen Influenza A2/Hongkong-Stamm sowie den Stamm A/swine/Taiwan. Für Teste mit den beiden letztgenannten Stämmen wurden die Seren mit Perjodat bzw. Perjodat und Trypsin vorbehandelt. Der Anteil der Tiere mit Serumtitern war gegen alle 3 Stämme in etwa gleich hoch. In ungefähr zwei Drittel der Bestände wurden positive Tiere gefunden. In diesen Beständen reagierten 57,8 % mit dem inhibitorempfindlichen Stamm, 48,4 % mit der inhibitorresistenten Variante und 48,8 % mit A/swine/Taiwan. Demgegenüber besaß von 300 Schweineseren kein einziges Antikörper gegen einen klassischen Schweineinfluenzastamm (A/swine/Iowa/15/31).

In der Bevölkerung der Slowakei hatte die Influenzaepidemie zwei Höhepunkte: den 1. von Mitte Februar bis Mitte Mai 1969, den 2. von Dezember 1969 bis März 1970.

Ältere Tiere, die es in den meisten der untersuchten Bestände gab, hatten demnach mindestens einmal, oft sogar zweimal die Möglichkeit mit dem Virus in Kontakt zu kommen. Den Schluß, daß sich ein großer Teil der Schweine mehrmals mit dem Erreger auseinandergesetzt haben müssen, lassen die relativ hohen Serumtiter zu. Erfahrungen von künstlichen Übertragungsversuchen lehrten, daß Schweine eine erste Infektion mit dem Hongkong-Virus mit der Bildung niedriger Antikörpertiter beantworten.

Berichten der WHO zufolge sind Hongkong-Infektionen beim Schwein auch in anderen Gebieten der Tschechoslowakei weit verbreitet. Bei der Prüfung von insgesamt ca. 1000 Seren, lag der Prozentsatz der Tiere mit spezifischen Antikörpern gegen Influenza A2/Hongkong bzw. A/swine/Taiwan 1970 je nach Herkunft und Alter der Tiere zwischen 53 % und 66 %. Die Titerwerte bewegten sich von 1:8 bis 1:640. Im gleichen Zeitraum wurden keine Fälle von Schweineinfluenza oder die Isolierung von Schweineinfluenzavirus gemeldet.

In der Sowjetunion konnte gleichzeitig mit dem Ansteigen von grippe-ähnlichen Erkrankungen bei Schweinen 1969/70 eine Zunahme von positiv reagierenden Tieren beobachtet werden. In den vorangegangenen Jahren waren nachweislich keine Influenzainfektionen in sowjetischen Schweinebeständen aufgetreten.

HAH-Titer von 1:40 und höher besaßen ca. 22 % aller Schweineseren, die 1970 in englischen Schweinebeständen gesammelt worden waren. Keines dieser Seren reagierte mit dem Schweineinfluenzastamm S/Cambridge/39. Seren, die vor 1969 gewonnen worden waren, zeigten keine Antikörpertiter gegen den Hongkong-Stamm.

Ebenfalls 1970 wurden in einem anderen englischen Institut 516 Seren von 15 Monate alten Sauen untersucht. Ca. 24 % aller Schweine reagierten mit Titern von 1:40 und höher im HAH-Test mit Influenza A2/ Hongkong. Die positiven Tiere stammten aus knapp der Hälfte der untersuchten Bestände. Auch bei diesen Untersuchungen konnten keine Serumtiter gegen die klassische Schweineinfluenza gefunden werden.

In den USA lag die prozentuale Verteilung von Schweinen mit Serumantikörpern gegen das Hongkong-Virus 1970 zwischen 1 % (6 bis 7 Monate alte Tiere) und 5 % (Sauen, 2 Jahre und älter). Daneben besaß ein Teil der Tiere HAH-Antikörper gegen das Schweineinfluenzavirus, das kurz zuvor Erkrankungen in Wisconsin verursacht hatte.

70 von 100 Schlachtschweinen reagierten in Korea im HAH-Test mit dem Influenzavirus A2/Hongkong mit Titern von 1:10 bis 1:160.

In Hongkong selbst waren 14%- 25 % der Schweine mit der Hongkong-Variante infiziert. Diese Zahlen wurden durch HAH-Teste mit 380 Seren von Schlachtschweinen gewonnen.

2.2.4. Experimentelle Untersuchungen

Die künstliche Infektion von Schweinen mit Influenza A2/Hongkong oder A/swine/Taiwan führt in der Regel zu einer klinisch inapparenten Verlaufsform. Experimentell infizierte Tiere bilden zwar spezifische Antikörper und scheiden gelegentlich das Virus über das Nasensekret aus, klinische Symptome treten aber nicht auf. Diese Beobachtungen konnten übereinstimmend zwei verschiedene Arbeitsgruppen machen.

Styk et al. (52) infizierten drei 6 Wochen alte Ferkel intranasal mit Influenza A2/Hongkong. 1 Ferkel wurde als Kontakttier gehalten. Vom 3. bis zum 7. Tag p.inf. schieden alle 3 infizierten Tiere über die Nasenschleimhaut Virus aus. Serologische Reaktionen waren bei diesen Tieren sehr schwach bis fraglich (2 Tiere) bzw. nicht (1 Tier) zu diagnostizieren. Eine Kontaktinfektion konnte nicht beobachtet werden.

Aus den Nasentupfern von 5 mit A/swine/Taiwan infizierten Ferkeln und 2 Kontrolltieren gelang die Reisolierung von Virus vom 1. bis zum 7. Tag bzw. 10. Tag (Kontrolltier) p. inf. Der Höhepunkt der Virusausscheidung lag bei dieser Versuchsgruppe um den 4. Tag p. inf. Ein virämisches Stadium konnte nicht nachgewiesen werden. Im HAH-Test reagierten, bis auf eines, alle Seren negativ. Nur ein Serum hatte am 7. Tag p. inf. einen HAH-Titer von 1:8/1:16.

Die geringe bis fehlende Antikörperbildung nach der künstlichen Infektion von Schweinen mit dem Hongkong-Virus und A/swine/Taiwan steht im Gegensatz zu den beobachteten Titern von natürlich infizierten Tieren. Die Autoren schließen daraus, daß unter natürlichen Bedingungen manche Schweine durch den mehrmaligen Kontakt mit dem Erreger geboostert werden.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Virus

Als Testvirus wurde für alle Hämagglutinationshemmungsteste das Influenzavirus, Stamm A2/Hongkong/1/68 (EIR) +) verwendet. Es handelt sich dabei um einen gegen Pferdeinhibitoren resistenten Stamm. Dieser Virusstamm ist zur Auffrischung von der 2. bis zur 11. Passage über die Amnionhöhle von bebrüteten Hühnereiern weitergezüchtet worden. Allantois- und Amnionflüssigkeiten der 9. bis 11. Eipassage mit gleichen HA-Titer wurden auf das Freisein von bakteriellen Kontaminationen geprüft, gepoolt und in kleinen Portionen abgefüllt bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Die Hämagglutinationsteste sind nach der üblichen Methode in 2er Potenzen ausgeführt worden (0,3 ml). Als Verdünnungsflüssigkeit diente physiologische Kochsalzlösung. Getestet wurde mit einer 0,5 %igen Suspension von Hühnererythrozyten. Als Hämagglutinationstiter ist die letzte Verdünnungsstufe gewertet worden, bei der noch eine vollständige Agglutination aller Erythrozyten eingetreten war. Der Hämagglutinationstiter des verwendeten Virusmaterials betrug 1:64.

+) Für die Überlassung des Stammes sind wir Herrn Dr. G.D. Schild, World Influenza Centre, London, zu Dank verpflichtet.

Das gepoolte Virusmaterial ist weiterhin auf seine Infektiosität geprüft worden. Mit der in 10er Potenzen verdünnten virushaltigen Allantoisflüssigkeit sind jeweils 5 Eier pro Verdünnungsstufe beimpft worden (0,1 ml). Eine stattgefundene Virusvermehrung wurde durch Titrierung der hämagglutinierenden Aktivität der geernteten Eiflüssigkeiten festgestellt. Die Berechnung der Infektiositätstiter erfolgte nach der Methode von Behrens (5) und Kärber (21).

Der Infektiositätstiter des verwendeten Viruspools betrug ca. $10^{6,5}$ EID_{50}/0,1 ml.

3.1.2. Seren

3.1.2.1. Herkunft der Seren

Für die Untersuchungen im Hämagglutinationshemmungstest (HAH-Test) sind 538 Seren verschiedener Herkunft verwendet worden:

1. 180 "Münchener" Seren 1968/69:

   Diese Seren sind 1968/69 auf dem Schlachthof München von gesunden Schlachtschweinen gewonnen worden.

2. 181 "bayerische" Seren 1968/69:

   Die Seren der zweiten Gruppe stammen von gesunden Schlachtschweinen aus verschiedenen bayrischen Schlachthöfen.

3. 177 "bayerische" Seren 1970/71:

   Bei der 3. Gruppe handelt es sich um Seren, die 1970/71 auf verschiedenen bayerischen Schlachthöfen von Schlachtschweinen gesammelt wurden.

Als negatives Kontrollserum diente ein Mischserum von keimfrei aufgezogenen Ferkeln [1]. Als positive Serumkontrolle verwendeten wir ein humanes Mischserum [2] mit einem HAH-Titer gegen Influenza A2/ Hongkong/1/68 von 1:64.

Alle Tiere unterlagen vor und nach der Schlachtung einer ordnungsgemäßen Schlachttier- und Fleischbeschau.

Bei den Tieren der Gruppe 1 und 2 sind keinerlei klinische und pathologisch-anatomische Mängel festgestellt worden. Tiere der Gruppe 3 zeigten vermehrt pneumonische Herde in der Lunge.

Die Blutentnahme erfolgte aus der durchtrennten Vena jugularis. Die Blutproben sind nach der Entnahme einige Stunden gelagert und dann durch Zentrifugieren bei 3000 U/min vom Blutkuchen befreit worden. Nach der Prüfung auf das Freisein von bakteriellen Kontaminationen sind die Seren bis zu ihrer Verwendung bei $-20^{\circ}C$ gelagert worden.

3.1.2.2. Behandlung der Seren

Alle Seren wurden vor ihrer Verwendung im HAH-Test bei $56^{\circ}C$ 30 Minuten inaktiviert.

Für die Überlassung der Seren danken wir Herrn Dr. E. Sickel [1] von der spf-Ferkelaufzuchtstation Marbach/ Neckar, und Frl. Dr. Ch. Epp [2], Staatliche Bakteriologische Untersuchungsanstalt München.

Daneben ist bei allen Seren stets eine Isoagglutininbehandlung durchgeführt worden. Zu diesem Zweck wurde dem inaktivierten Serum eine 5 %ige Suspension von Hühnererythrozyten im Verhältnis 1:4 zugesetzt. Die Serum-Erythrozyten-Gemische inkubierten über Nacht bei Kühlschranktemperatur (+4°C) und wurden danach bei 3000 U/min 10 Minuten zentrifugiert.

Kaolinbehandlung: Zur Entfernung unspezifischer Inhibitoren sind daneben in einer zweiten Versuchsreihe einige Seren mit Kaolin vorbehandelt worden. Bei der Durchführung hielten wir uns an die von Antoniadis empfohlene Methode (3).

Zu 0,4 ml inaktiviertem Serum werden 2,1 ml physiologische Kochsalzlösung und 2,0 ml einer 25 %igen Kaolinsuspension (25 g säuregewaschenes Kaolin in physiologischer Kochsalzlösung) gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 20 Minuten bei Zimmertemperatur wird das Gemisch 30 Minuten bei ca. 750 U/min. zentrifugiert. Um eine weitere Verdünnung des Serums zu vermeiden, ist die Isoagglutininbehandlung mit einer 50 %igen Erythrozytensuspension durchgeführt worden. Dem vorbehandelten Serum wurden 0,1 ml der 50 %igen Suspension zugesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlschrank (4°C), sie wurde durch das Abzentrifugieren der Erythrozyten (10 Minuten, 3000 U/min) abgeschlossen. Das fertig präparierte Serum war ungefähr 1:10 verdünnt.

3.1.3. Hämagglutinationshemmungstest

Für die HAH-Teste sind die inaktivierten und vorbehandelten Seren in 2er Potenzen beginnend mit einer Verdünnung von 1:8 (kaolin-behandelte Seren 1:10) in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt worden. Es wurde mit einem Volumen von jeweils 0,3 ml gearbeitet.

Zu jeder Serumverdünnung wurde das gleiche Volumen Antigen, das auf 8 hämagglutinierende Einheiten eingestellt war, gegeben. Die Reaktion erfolgte über 30 Minuten bei Zimmertemperatur. Sie wurde durch Zugabe von jeweils 0,3 ml Erythrozytensuspension (0,5 %ig) abgeschlossen. Nach vollständigem Absetzen der Erythrozyten (ca. 45 Minuten), wurde der Test abgelesen.

Allen Testansätzen liefen grundsätzlich entsprechende Kontrollen parallel. Als Antigenkontrolle wurde die verwendete Virus-Gebrauchsverdünnung in 2er Potenzen austitriert, um die korrekte Einstellung der hämagglutinierenden Einheiten zu prüfen. Als Normalserumkontrolle kam ein Mischserum von keimfrei aufgezogenen Ferkeln, als positive Serumkontrolle ein humanes Mischserum (HAH-Titer 1:64) zum Einsatz. Außerdem wurde stets eine Erythrozytenkontrolle angesetzt. Als Hämagglutinationshemmungstiter wurde die letzte Verdünnungsstufe gewertet, bei der eine vollständige Hemmung der Agglutination zu beobachten war.

3.1.4. Neutralisationstest

Für Vorversuche sind die inaktivierten Seren 1:8 in Veronalpuffer verdünnt und anschließend mit dem gleichen Volumen einer auf 100 EID_{50}/0,1 ml eingestellten Virussuspension versetzt worden. Im Hauptversuch wurde von positiven Seren eine Verdünnungsreihe in 2er Potenzen hergestellt und zu jeder Verdünnungsstufe jeweils das gleiche Volumen der Virus-Gebrauchsverdünnung (100 EID_{50}/0,1 ml) gegeben. Die Reaktion erfolgte über eine Stunde bei 4°C im Kühlschrank.

Die Virus-Serum-Gemische sind danach sofort auf je 5 Eier (10 Tage bebrütet) verimpft worden. Die Impfdosis betrug 0,2 ml pro Ei. Die Bebrütung der beimpften Eier erfolgte bis zum 3. Tag p. inf. im Brutschrank (37°C), eine stattgefundene Virusvermehrung ist durch den Nachweis der positiven Hämagglutination festgestellt worden. Die Serumtiter sind nach der Methode von Behrens (5) und Kärber (21) berechnet worden.

Jedem Versuchsansatz ist eine Viruskontrolle (Austitrierung der Virus-Gebrauchsverdünnung) sowie positive und negative Serumkontrollen (siehe HAH-Teste) parallel gelaufen.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Untersuchung von unbehandelten Seren bezüglich Vorkommen von hämagglutinationshemmenden Antikörpern gegen Influenza A2/Hongkong/1/68 (EIR)

Der uns vom World Influenza Centre London für die Untersuchungen überlassene Influenzastamm gilt als resistent gegenüber unspezifischen Inhibitoren in Pferdeseren (equine inhibitor resistent). Aus diesem Grunde sind zunächst sämtliche Seren ohne Inhibitorbehandlung mit diesem Stamm auf das Vorkommen hämagglutinationshemmender Antikörper untersucht worden. Sie wurden zu diesem Zwecke, wie bereits unter "Material und Methoden" beschrieben, nur inaktiviert und zur Entfernung der Isoagglutinine an Erythrozyten absorbiert. Als Virus-Gebrauchsdosis dienten, abweichend von der üblichen Technik, 8 hämagglutinierende Einheiten, da in Vorversuchen mit 4 hämagglutinierenden Einheiten die Normalserumkontrolle, ein Mischserum von keimfrei aufgezogenen Ferkeln, einen HAH-Titer von 1:32 besaß. Bei Verwendung der höheren Virusdosis blieb dieses Serum negativ.

Die Ergebnisse dieser HAH-Teste sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Wegen der hohen Antigeneinstellung wurden Serumtiter ab 1:8 als positiv bewertet. In der Tabelle ist sowohl der zahlenmäßige als auch der prozentuale Anteil der Seren für die jeweiligen Titer aufgeführt. Der höchste beobachtete Wert lag bei 1:64. Die Mehrzahl der Seren besaß Titer von 1:8 und 1:16.

Bei den in den Jahren 1968/69 gesammelten Seren reagierten, unabhängig von ihrer Herkunft stets mehr als 50 % positiv. Bei den "bayerischen" Seren lag der Prozentsatz bei 53,4 %, bei den "Münchener" Seren bei 54,7 %. Demgegenüber besaßen von den 177 aus dem Winter 1970/71 stammenden Seren nur 34,5 % Titer von 1:8 und höher. Dieses Verhältnis änderte sich auch nicht wesentlich, wenn nur Seren mit Titern ab 1:16 gewertet wurden. Wiederum ist der Anteil der positiven Seren in der Gruppe von 1970/71 niedriger (5,7 %) als in denen von 1968/69 (bayerische Seren: 11,7 %; Münchener Seren: 9,4 %).

3.2.2. Untersuchung von Kaolin-vorbehandelten Seren auf das Vorkommen hämagglutinationshemmender Antikörper gegen Influenza A2/Hongkong/1/68 (EIR)

Veranlaßt durch die Ergebnisse der ersten HAH-Teste mit unbehandelten Seren, sind in einer zweiten Versuchsanordnung alle positiven Seren mit Kaolin vorbehandelt und nochmals im HAH-Test untersucht worden. Für diese Teste ist die Virus-Gebrauchsdosis auf 4 hämagglutinierende Einheiten eingestellt worden, da die Normalserumkontrolle nach Kaolinbehandlung auch gegen die niedrigere Virusdosis negativ blieb.
Die Resultate sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Serumtiter ab 1:10 galten als positiv. Der höchste beobachtete Titer lag bei 1:40.

Bei den Serumgruppen, die 1968/69 auf dem Münchener und verschiedenen bayerischen Schlachthöfen gesammelt worden waren, sank nach der Kaolinbehandlung der Anteil positiv reagierender Seren signifikant ab. Nur noch 2,75 % der "bayerischen" und 1,1 % der "Münchener" Seren besaßen HAH-Titer. Auch in der Gruppe der 1970/71 entnommenen Seren verringerte sich die Zahl der positiven Seren durch die Inhibitorbehandlung. Im Gegensatz zu den anderen 2 Gruppen liegt aber hier der Prozentsatz bei 6,3 % also wesentlich höher (Tabelle 2).

3.2.3. Vergleich der HAH-Titer von unbehandelten und Kaolin-vorbehandelten Seren

Aus den Ergebnissen der zweiten Versuchsserie ist zu ersehen, daß durch die Kaolinbehandlung der Prozentsatz positiv reagierender Seren rapide absinkt. In diesem Zusammenhang war nun interessant zu prüfen, ob generell alle Seren einen Titerverlust erleiden und ob Unterschiede in den Serumgruppen verschiedener Herkunft bezüglich derartiger Verluste bestehen. Zu diesem Zweck sind die Prozentzahlen aus den beiden Versuchsansätzen in der Tabelle 3 einander gegenübergestellt worden.

Während in den ersten beiden Gruppen nach Kaolinbehandlung nur noch 2,75 % bzw. 1,1 % positiv waren, d.h. nur noch ca. 1/25, sank der Anteil in der Gruppe 1970/71 nur um ca. 5/6 auf 6,3 %.

Allerdings waren auch unter den älteren Seren solche, die trotz Inhibitorbehandlung ihre Titer in ungefähr gleicher Höhe behielten. So ist beim Vergleich der Tabellen 1 und 2 zu erkennen, daß ein Serum aus der "bayerischen" Gruppe unbehandelt einen Titer von 1:32 und nach Kaolinbehandlung von 1:40 aufwies. In der zweiten Gruppe von 1968/69 sank der Titer eines Serums nach der Behandlung von 1:64 auf 1:20, das eines zweiten von 1:32 auf 1:10. Trotzdem wird deutlich, daß die Mehrzahl der beobachteten positiven Reaktionen durch die Behandlung mit Kaolin verlorengingen.

Etwas anders liegen die Verhältnisse bei den erst im letzten Jahr gesammelten Seren. Durch die Vorbehandlung verringerte sich der Anteil der positiven Reagenten nicht so stark.

Reagierten ohne Serumbehandlung 5,7 % mit Titern von 1:16 und höher, so zeigten nach der Adsorption an Kaolin noch 6,3 % Werte von 1:10 und 1:20.

3.2.4. Ergebnisse vergleichender Neutralisationsteste

Insgesamt 33 Seren sind zusätzlich in Neutralisationstesten im bebrüteten Hühnerei auf das Vorkommen von Antikörpern geprüft worden. Diese Seren teilen sich in 2 Gruppen auf. Die erste Gruppe enthält 21 Seren, die ihren HAH-Titer von 1:16 durch die Vorbehandlung verloren hatten. Die restlichen 12 Seren hatten durch die Vorbehandlung ihren Titer nicht oder nur unwesentlich geändert.

Da nach Shortridge (47) die beim Schwein vorkommenden Inhibitoren kaum neutralisierend wirken, sollte durch diesen Test geprüft werden, ob die durch Kaolin entfernten Hemmsubstanzen in jedem Fall unspezifisch waren.

Die Auswertung dieser Versuche zeigte, daß nur 6 der nach Kaolinbehandlung negativen Seren negativ, 4 dagegen fraglich und 11 positiv reagierten. Von den 12 im HAH-Test stets positiven Seren besaßen 10 auch neutralisierende Antikörper, bei 2 konnte bei einer Serumverdünnung von 1:8 keine Reaktion beobachtet werden.

Die Befunde deuten darauf hin, daß durch die Inhibitorbehandlung kleinere Antikörpermengen mit entfernt werden. Dadurch ist vor allem bei kleinen Serumtitern die Gefahr gegeben, daß unspezifische Reaktionen vorgetäuscht werden.

3.3. Diskussion

Wir hatten uns zunächst mit zwei Schwierigkeiten auseinanderzusetzen.

In Vorversuchen stellte es sich heraus, daß bei der Verwendung von 4 hämagglutinierenden Einheiten als Antigen-Gebrauchsdosis (übliche, von der WHO empfohlene Antigenmenge) in unbehandelten Schweineseren hohe unspezifische Titer auftreten. Mit dieser Antigenmenge hatte z.B. ein als Normalserumkontrolle verwendetes Mischserum aus keimfrei aufgezogenen Ferkeln, das bereits gegen die unterschiedlichsten Virusarten getestet worden war und immer negativ reagiert hatte, einen Titer von 1:32. Nach Erhöhung der Antigendosis auf 8 hämagglutinierende Einheiten, reagierte das Kontrollserum negativ. In allen folgenden Versuchen mit unbehandelten Seren haben wir deshalb mit 8 hämagglutierenden Einheiten gearbeitet.

Unspezifische Reaktionen ließen sich daneben auch durch die Absorption der Inhibitoren vermeiden. Die besten Ergebnisse erhielten wir bei der Verwendung von Kaolin. Nach einer Vorbehandlung mit Kaolin setzten wir die HAH-Teste wieder mit 4 hämagglutinierenden Einheiten an.

Die zweite Schwierigkeit bestand darin, daß ein großer Teil der Seren HAH-Titer von 1:8 besaß (siehe Tabelle 1). Nur bei einem kleinen Prozentsatz konnten höhere Werte gefunden werden.

Der verwendete Virusstamm war als "equine inhibitor resistent" deklariert und hätte deshalb aufgrund der großen Ähnlichkeit von Pferde- und Schweine-Inhibitoren auch mit Schweineseren keine unspezifischen Reaktionen zeigen dürfen. In unseren Untersuchungen war er aber gegenüber Schweineserum-Inhibitoren nicht resistent. Wir haben aus diesem Grund alle Serumproben mit Titern ab 1:8 nach einer Vorbehandlung mit Kaolin ein zweites Mal im HAH-Test untersucht. Bei diesen Testen ist der größte Teil der Serumtiter, vor allem der niedrigen Serumtiter, verlorengegangen. Dabei fiel auf, daß die 1968/69 gesammelten Seren zu einem höheren Prozentsatz nach einer Kaolin-Vorbehandlung negativ wurden, als die erst kürzlich (1970/71) gesammelten. Bei den Serumgruppen von 1968/69 sanken die positiven Werte von 53,4 % bzw. 54,7 % auf 2,75 % bzw. 1,1 %, bei den frischen Seren von 34,5 % auf 6,3 %. Interessant ist dabei, daß die letzte Zahl fast genau mit dem Anteil von Seren übereinstimmt, der in der Gruppe von 1970/71 ohne Vorbehandlung Titer von 1:16 und höher besaß. Die Ursache für diese Beobachtung ließ sich nicht klären, es muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß sich Seren nach längerem Lagern anders verhalten als frische Seren.

Die besprochenen Schwierigkeiten machten eine Aussage über das derzeitige prozentuale Vorkommen von Hongkong-Infektionen bei unseren Schweinen sehr schwer. Eines beweisen die vorliegenden Ergebnisse aber auf alle Fälle: Infektionen mit Influenza A2/Hongkong sind auch in bayerischen Schweinebeständen in den letzten Jahren vorgekommen.

Dies geht aus der vergleichenden Auswertung der Ergebnisse von HAH-Testen mit unbehandelten und Kaolin-vorbehandelten Seren hervor.

Es ist bekannt, daß durch die enge chemisch-morphologische Verwandtschaft von unspezifischen Inhibitoren und spezifischen Antikörpern jede Inhibitorbehandlung mehr oder weniger stark auch vorhandene Antikörpertiter in Mitleidenschaft zieht. Bei den von uns beobachteten niedrigen HAH-Titern wäre es deshalb nicht verwunderlich, wenn auch ein großer Teil von spezifischen Reaktionen durch die Vorbehandlung der Seren mit verlorengegangen ist. Es kann aus diesem Grunde angenommen werden, daß der prozentuale Anteil von Schweinen, die sich mit diesem Influenzastamm auseinandergesetzt haben, über dem von uns erfaßten liegt.

Daß auch niedrige Serumtiter spezifisch für eine A2/Hongkong-Infektion sein können, beweisen die Untersuchungen von Styk et al. bei Schweinen (52) und Blaskovic et al. bei Pferden (6). Sie stellten übereinstimmend fest, daß nach einer Erstinfektion nur geringe Antikörpermengen im Serum nachweisbar sind.

Bei derartig niedrigen Werten ist es aber mit den uns zur Verfügung stehenden Methoden nicht möglich, eine genaue Trennung von spezifischen und unspezifischen Reaktionen durchzuführen. Diese Erfahrung fanden wir auch durch die Verwendung des Neutralisationstestes, der nach Shortridge (47) durch γ -Inhibitoren kaum beeinträchtigt wird, bestätigt.

Bei der vergleichenden Testung von positiven Seren, die durch die Vorbehandlung mit Kaolin teilweise ihre Titer verloren hatten, reagierte nur ungefähr die Hälfte auch im Neutralisationstest negativ. Die Befunde beweisen, daß bei der Entfernung unspezifischer Inhibitoren auch ein gewisser Prozentsatz von Antikörpern verlorengeht.

Die Untersuchungen Kaolin-vorbehandelter Seren geben allerdings sicher ein realistischeres Bild über die Verbreitung von Hongkong-Infektionen in den Schweinebeständen Bayerns als Untersuchungen mit unbehandelten Seren. Auch wenn damit gerechnet werden muß, daß nicht alle Schweine, die sich mit diesem Virus auseinandergesetzt haben, durch diesen Test erfaßt wurden, geht aus den gewonnenen Zahlen deutlich hervor, daß die Infektionen beim Schwein etwa denen beim Menschen parallel verlaufen. 1968/69, als aus Süddeutschland nur einzelne Fälle von Hongkong-Grippe gemeldet wurden, lag der Prozentsatz der infizierten Schweine bei 2,75 % bzw. 1,1 %, im Winter 1970/71 war er auf 6,3 % angestiegen. Es ist anzunehmen, daß serologische Untersuchungen im Winter 1969/70 noch erfolgreicher gewesen wären.

Durch die Arbeiten von Styk et al. (52) ist nachgewiesen worden, daß Influenza A2/Hongkong ohne Schwierigkeiten experimentell auf Schweine übertragen werden kann. Erkrankungen werden dabei aber nicht ausgelöst. Serologische Untersuchungen in verschiedenen Ländern zeigten, daß Schweine sich auch unter natürlichen Bedingungen klinisch inapparent mit dem Erreger auseinandersetzen.

Diese Beobachtungen konnten durch die vorliegenden Befunde bestätigt werden. Trotz der positiven serologischen Reaktionen sind in Bayern während der Hongkong-Epidemie keine influenza-ähnlichen Erkrankungen bei Schweinen gemeldet worden.

Eine kritische Durchsicht der vorhandenen Literatur über das Vorkommen von Antikörpern gegen Influenza A2/Hongkong bei verschiedenen Tierarten zeigt, daß die Angaben über den Grad der Verseuchung einer Population und die Höhe der Serumtiter recht unterschiedlich sind. Nach den Erfahrungen, die während der vorliegenden serologischen Untersuchungen gesammelt werden konnten, liegt der Schluß nahe, daß diese Differenzen nur zum Teil auf tierartliche Besonderheiten, zum Teil aber auch auf Unterschiede in der Technik und der Bewertung der Resultate zu suchen ist.
So ist es z.B. nur begrenzt möglich, die Titer von Seren verschiedener Tierarten zu vergleichen, wenn diese Seren nicht zufällig gleiche oder ähnliche Inhibitoren besitzen und deshalb nach der selben Methode vorbehandelt wurden. Die Vergleichsmöglichkeiten würden wesentlich verbessert, wenn von einer zentralen Stelle, d.h. am günstigsten von den internationalen Influenzazentren, gleichzeitig mit Referenz-Virusstämmen positive (und negative) Kontrollseren der entsprechenden Tierarten bereitgestellt würden. Der Mehraufwand würde dabei durch den Vorteil ausgeglichen, daß die Versuchsanordnung in allen Laboratorien auf die gleichen Bezugsgrößen eingestellt werden könnten.

Z U S A M M E N F A S S U N G

538 Seren von Schlachtschweinen aus verschiedenen Beständen Bayerns wurden auf hämagglutinationshemmende Antikörper gegenüber Influenza A2/Hongkong/1/68 untersucht. 361 Seren stammten aus den Jahren 1968/69, 177 aus dem Winter 1970/71.

Bei Verwendung von unbehandelten Seren kam es zu starken unspezifischen Reaktionen. Nach einer Vorbehandlung mit Kaolin besaßen ca. 2 % der aus den Jahren 1968/69 stammenden Seren und ca. 6,3 % der 1970/71 gesammelten Seren Antikörpertiter gegen Influenza A2/ Hongkong/1/68.

Mit Hilfe von Neutralisationstesten konnte nachgewiesen werden, daß durch die Vorbehandlung mit Kaolin kleine Mengen spezifischer Antikörper entfernt werden.

Die beobachteten Serumtiter waren in der Regel sehr niedrig, sie überstiegen selten Werte von 1:10 bis 1:20.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen machen es wahrscheinlich, daß Influenza A2/Hongkong-Infektionen bei Schweinen vorkommen und in den bayerischen Schweinebeständen möglicherweise parallel zu den menschlichen Infektionen aufgetreten sind.

S U M M A R Y :

538 swine sera collected from different slaughter houses in Bavaria were examined for antibody to influenza A2/Hong Kong/1/68 in haemagglutination-inhibition (HI) tests.
361 sera were collected 1968/69, 177 during the winter 1970/71.

Untreated sera showed unspecific reactions in a high percentage. About 2 % of the sera from 1968/69 and 6,3 % from 1970/71 gave positive reactions after treatment with kaolin.

It could be demonstrated by the serum-neutralisation test that kaolin also removes small amounts of specific antibodies.

The inhibition titers observed after kaolin-treatment were very low (1:10 to 1:20).

The results indicate that influenza A2/Hong Kong can also infect pigs and show some correlation to epidemic in man.

Tabelle 1: Hämagglutinationshemmende Antikörper gegen Influenza A2/Hongkong in 538 Schweineseren
- unbehandelte Seren -

Jahr	Herkunft und Anzahl der Seren	Serumtiter im HAH-Test				
		< 1:8	1:8	1:16	1:32	1:64
1968/69	180 bayerische Seren	84 (46,6%)	75 (41,7%)	20 (11,1%)	1 (0,6%)	-
	181 Münchener Seren	82 (45,3%)	82 (45,3%)	15 (8,3%)	1 (0,55%)	1 (0,55%)
	Summe: 361	166 (45,9%)	157 (43,5%)	35 (9,7%)	2 (0,6%)	1 (0,3%)
1970/71	177 bayerische Seren	116 (65,5%)	51 (28,8%)	7 (4%)	2 (1,1%)	1 (0,6%)

Tabelle 2: Hämagglutinationshemmende Antikörper gegen Influenza A2/Hongkong in 538 Schweineseren
- Seren mit Kaolin vorbehandelt -

Jahr	Anzahl und Herkunft der Seren	Serumtiter im HAH-Test			
		< 1:10	1:10	1:20	1:40
1968/69	180 bayerische Seren	175 (97,25%)	4 (2,2%)	-	1 (0,55%)
	181 Münchener Seren	179 (98,9%)	1 (0,55%)	1 (0,55%)	-
	Summe: 361	354 (98,0%)	5 (1,4%)	1 (0,3%)	1 (0,3%)
1970/71	177 bayerische Seren	166 (93,7%)	7 (4,0%)	4 (2,3%)	-

Tabelle 3: Prozentualer Anteil positiver Seren vor und nach Kaolinbehandlung

Jahr	Anzahl und Herkunft der Seren	Serumtiter im HAH-Test			
		ohne Vorbehandlg.		Kaolinbehandlung	
		negativ (< 1:8)	positiv (1:8–1:64)	negativ (< 1:10)	positiv (1:10–1:40)
1968/69	180 bayerische Seren	46,6	53,4	97,25	2,75
	181 Münchener Seren	45,3	54,7	98,9	1,1
	Summe:	45,9	54,1	98,0	2,0
1970/71	177 bayerische Seren	65,5	34,5	93,7	6,3

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1.) Andrewes, C. H., Laidlaw, P.P. and W. Smith, 1934 : The susceptibility of mice to the viruses of human and swine Influenza.
Lancet. II, 859-862.

2.) Andrewes, C. H., Laidlaw, P.P. and W. Smith, 1935 : Influenza: Observations on the recovery of virus from man and on the antibody content of human serum.
Brit. J. Exp. Path. 16, 566-574.

3.) Antoniadis, G. und M. Woytek, 1970 : Über die Stammspezifität von Seruminhibitoren. Vergleichende serologische Untersuchungen mit den Influenzavirusstämmen A_2/Berlin/2/68 und A_2/Hong Kong/1/68.
Zbl. Bakt. I. Orig. 214, 186-197.

4.) Beare, A. S., Schild, G. C., Hall, T. S. and W. D. Kundin, 1971: Antigenic characteristics of swine influenza virus closely related to human Hong Kong strain and results of experimental infection in volunteers.
Lancet., 305-306.

5.) Behrens, B., 1929 : Auswertung der Digitalisblätter im Froschversuch.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 140, 327.

6.) Blaskovic, D., Kapitancik, B., Sabó, A., Styk, B., Vrtiak, O. and M. Kaplan, 1969 : Experimental infection of horses with A-equi2/Miami/1/63 and human A2/Hongkong/1/68 influenza viruses.

I. The course of infection and virus recovery. Acta virol. (engl. ed.) 13, 499-506.

7.) Blaskovic, D., Kapitancik, B., Sabó, A., Styk, B., Vrtiak, O. and M. Kaplan, 1969 : Experimental infection of horses with A-equi2/Miami/1/63 and human A2/Hongkong/1/68 influenza viruses.

II. Antibody response to the infection. Acta virol. (engl. ed.), 13, 502-514.

8.) Blaskovic, D., Rathova, V., Skoda, R., Kociskova, D. and M. M. Kaplan, 1970 : Experimental infection of weanling pigs with A/swine influenza virus.

1. Epidemiology and serological response. Bull. Wld. Hlth. Org. 42, 757-765.

9.) -"- 2. The shedding of virus by infected animals. Bull. Wld. Hlth. Org. 42, 767-770.

10.) -"- 3. Immunity in piglets farrowed by antibody - bearing dams experimentally infected a year earlier. Bull. Wld. Hlth. Org. 42, 771-777.

11.) Dasen, L. A. and W. G. Laver ,1970: Antibodies to influenza viruses (including the human A2/Asian/57/strain) in sera from Australian shearwaters (puffinus pazificus)

Bull. Wld. Hlth. Org. 42, 885-889.

12.) Davenport, F. M., Hennessy, M. D., Drescher, J., Mulder, J. and T. Francis, 1964 : Further observations of the relevance of serologic recapitulations of human infection with influenza viruses.

J. exp. Med. 120, 1087-1097.

13.) Domracheva, Z. V., 1968 : An influenza A2 outbreak in men and horses (Russian). Problem grippa i ostrykh respiratornykh zabolevanii.

Tez. dokl. nauch. Sess. Inst. AMN SSSR Moscow 47 (1959), ref. in Hoyle, L., 1968: The influenza viruses.

14.) Easterday, B. C., 1969 : Discussion on antigenic relationship of animal and human influenza viruses.

Bull. Wld. Hlth. Org. 41, 447-452.

15.) Francis, T., Jr. and T. P. Magill, 1936 : The incidence of neutralizing antibodies for human influenza virus in the serum of human individuals of different ages.

J. exp. Med. 63, 655-668.

16.) Francis, T., Jr. and R. E. Shope, 1936 : Neutralisation tests with sera of convalescent or immunized animals and the viruses of swine and human influenza. J. exp. Med. 63, 645-653.

17.) Gaidamaka, M. G., Vaganov, G. P., Dromashko, A. S., Shvetskava, B. D. and D. D. Fyadina, 1959 : Disease of the upper respiratory tract in horses following the human influenza epidemic of 1957. Bull. Wld. Hlth. Org. 20, 505-508.

18.) Hoyle, L., 1968 : The influenza viruses. Springer Verlag, Wien, New York

19.) Johnson, D. O., Wooding, W. L., Tanticharoenyos, P. and Ch. Karnjanaprakorn, 1971 : An epizootic of A2/Hongkong/68 influenza ingibbons. J. Infect. Dis. 123, 365-370.

20.) Kalter, S. S., Heberling, R.J., Vice, T. E., Life, F. S. and A. R. Rodriguez, 1969: Influenza (A2/Hongkong/68) in the baboon (Papio sp.) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 132, 357-361.

21.) Kärber, G., 1931 : Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Nauyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 162, 480.

22.) Kaplan, M., 1969: Relationships between animal and human influenza. Bull. Wld. Hlth. Org. 41, 485-486.

23.) Kaplan, M., and A. M. M. Payne, 1959 : Serological survey in animals for type an influenza in relation to the 1957 pandemic. Bull. Wld. Hlth. Org. 20, 465-488.

24.) Kasel, J. A., and R. B. Couch, 1969 : Experimental infection in man and horses with influenza A viruses. Bull. Wld. Hlth. Org. 41, 447-452.

25.) Keith, E., and W. D. Peterson, Jr., 1957: Comparative measurements of antigenic differences among human and swine influenza viruses. J. Immunol. 78, 365-372.

26.) Koen, J.S., 1919: A practical method for field diagnosis of swine diseases. Amer. J. Vet. Med. 14, 468-470.

27.) Kundin, W. D., 1970: Hongkong A2 Influenza virus infection among swine during a human epidemic in Taiwan. Nature. Vol. 228, 857.

28.) Mann, J. J., Rossen, R. D., Lehrich, J. R. and J. A. Kasel, 1967 : The effect of kaolin on immunoglobulins: an improved technique to remove the nonspecific serum inhibitor of reovirus hemagglutination. J. Immunol., 98, 1136.

29.) Marine, M. M., Workman, W. M. and R. G. Webster, 1969 : Immunological interrelationships of Hong Kong Asian and equi-2 influenza viruses in man.
Bull. Wld. Hlth. Org. 41, 475-482.

30.) Marois, P., Pavilianis, V. Boudreault, A. and E. Franco, 1963 : An outbreak of type A 2 influenza among horses.
Canad. J. Comparat. Med. Vet. Sci. 27, 257-260.

31.) Masurel, N. and J. Mulder, 1966 : Studies on the content of antibodies for equine influenza viruses in human sera.
Bull. Wld. Hlth. Org. 34, 885-893.

32.) Mateev, M., Lyntskanov, D., Nikolova, Z., Chenchev, J. and T. S. Tsonev, 1970 : Equine influenza caused by A2/Hongkong virus in Bulgaria.
Vet. Sbir., Sofia, 167, 3-6. ref.: Vet. Bull. 41, No. 611 (1971).

33.) Mc Cahon, D. and G. C. Schild, 1971 : An investigation of some factors affecting cross-reactiviation between influenza A viruses.
J. gen. Virol. 12, 207-219.

34.) Paniker, C. K. J. and C. M. G. Nair, 1970 : Infection with A2 Hong Kong Influenza virus in domestic cats.
Bull. Wld. Hlth. Org. 43, 859-862.

35.) Romvary, J., Takatsy, G., Barb, K. and E. Farkas, 1962 : Isolation of influenza virus strains from animals. Nature. 193, 907-908.

36.) Sandow, D. und W. Wildführ, 1970: Vergleichende serologische Untersuchungen mit den Influenzavirusstämmen A_2/Hong Kong/1/68 und A_2DDR-Berlin 1/67 bei Schweinen. Mhft. Vet. Med. 25, 320-322.

37.) Shope, R. E.,1934 a : The infection of ferrets with swine influenza virus. J. exp. Med. 60, 49-61.

38.) Shope, R. E.,1935 : The infection of mice with swine influenza virus. J. exp. Med. 62, 561-572.

39.) Shope, R. E.,1936 b : The incidence of neutralizing antibodies for swine influenza viruses in the sera of human beings of different ages. J. exp. Med. 63, 669-684.

40.) Shope, R. E., 1937 : Immunological relationships between the swine and human influenza viruses in swine. J. exp. Med. 66, 151-168.

41.) Shope, R. E., 1938 : Serologic evidence for the occurrence of infection with human influenza virus in swine. J. exp. Med. 67, 739-748.

42.) Shope, R. E., 1941: The swine lungworm as a reservoir and intermediate host for swine influenza virus.
I. The presence of swine influenza virus in healthy and susceptible pigs.
J. exp. Med. 74, 41-47.

43.) -"- II. The transmission of swine influenza virus by the swine lungworm.
J. exp. Med. 74, 49-68.

44.) -"- III. Factors influencing transmission of the virus and the provocation of influenza.
J. exp. Med. 77, 111-126.

45.) -"- IV. The demonstration of masked swine influenza in lungworm larvae and swine under natural conditions.
J. exp. Med. 77, 127-138.

46.) Shope, R. E. and T. Francis, Jr., 1936: The susceptibility of swine to the virus of human influenza.
J. exp. Med. 64, 791-801.

47.) Shortridge, K. F., Belyavin, G. and D. E. Bidwell, 1970: The occurrences of human influenza virus antibodies in the sera of certain wild species of animal.
Arch. ges. Virusforsch. 32, 286-290.

48.) Sigel, M. M., Lee, J. C. and W. G. Gilmartin, 1971: Virological studies in dolphins. Internat. Assoc. for Aquatic Animal Medicine Conference, Guelph, Ontario, April 1971.

49.) Smith, W., Andrewes, C. H. and P. P. Laidlaw, 1933: A virus obtained from influenza patients. Lancet. II, 66-68.

50.) Smith, W., Andrewes, C. H. and P. P. Laidlaw, 1935: Influenza: Experiments on the immunization of ferrets and mice. Brit. J. Exp. Path. 16, 291-304.

51.) Blaskovic, D., Sabo, A., Hana, L., Kapitancik, B. and M. Kaplan, 1970: Experimental infection of horses with A-equi2/Miami/1/63 and human A2/Hong Kong/1/68 influenza viruses. III. Immunodiffusion Study of the Antibody Response. Acta virol. 14, 35-46

52.) Styk, B., Sabo, A. and D. Blaskovic, 1971: Experimental infection of pigs with Hong Kong influenza viruses. Acta virol. 15, 221-225.

53.) Styk, B., Sabo, A., Blaskovic, D., Masarova, P., Russ, G. and L. Hana, 1971: Antibody against Hong Kong influenza viruses in pigs. Acta virol. 15, 211-219.

54.) Todd, J. D., Lief, F. S. and D. Cohen, 1970: Experimental infection of ponies with the Hong Kong variant of human influenza virus. Amer. J. Epidem. 92, 330-336, ref.: Vet. Bull. 41, 1705.

55.) Voth, D. W. and H. A. Feldman, 1963: Aqueous, Repository and Placebo influenza vaccines in an elderly population. Amer. J. Publ. Health. 53, 1512.

56.) Webster, R. G., 1969: Antigenic variation in influenza viruses, with special reference to Hong Kong influenza. Bull. Wld. Hlth. Org. 41, 483-485.

57.) Webster, R. G. and L. W. Greame, 1971: Antigenic variation in influenza virus. Biology and chemistry. Progress in Medical Virology 13, 271-338.

58.) Webster, R. G. and H. G. Pereira, 1968: A common surface antigen in influenza viruses from human and avian sources. J. gen. Virol. 3, 201-208.

59.) Wld. Hlth. Org., Tech. Reports Series No. 408, 1969

Herrn Prof. Dr. A. M a y r danke ich an dieser Stelle nochmals für die Überlassung des Themas sowie für seine freundliche und hilfreiche Unterstützung.

L E B E N S L A U F

Ich, Siegfried Moser, wurde am 13. Juni 1943 als erstes Kind der Eheleute Siegfried Moser und Cäcilia Moser, geb. Rendl, in Passau geboren.

1949 wurde ich in der Volksschule Fürstenstein im Ldkrs. Passau eingeschult und ab 1953 besuchte ich die Volksschule Pullach im Isartal.

1954 wechselte ich auf das Humanistische Theresiengymnasium in München über, an dem ich bis zur 6. Klasse blieb. Anschließend besuchte ich bis zum Abitur das Humanistische Nymphenburger Gymnasium in München-Gern. Im Juli 1965 bestand ich dort die Reifeprüfung.

Vom Winter 1965 bis zum Sommer 1970 studierte ich in München 9 Semester Tiermedizin. Im August 1970 bestand ich mein Staatsexamen und erhielt meine Bestallung als Tierarzt.